مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۶، شهریور۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۳)

تعیین ارتباط فیلوژنی ویبریو پاراهمولیتیکوس های جدا شده از خلیج‌فارس و ارزیابی حساسیت آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها

سارا حق نگهدار[۱]، مجید باصری صالحی[۲*]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز، ایران، [۲]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۸

چکیده

زمینه و هدف: ویبریو پاراهمولیتیکوس باکتری نمک دوست گرم منفی است که در محیط‌های آبی یافت می‌شود. این باکتری از عوامل حاد بیماری روده‌ای پس از مصرف غذاهای دریایی نپخته و یا خام محسوب می‌گردد. علایم بیمار ویبریو پاراهمولیتیکوس اسهال آبکی، درد شکم، تهوع، استفراغ، تب، سردرد و اسهال همراه با خون می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی ویبریو پاراهمولیتیکوس از خلیج‌فارس و تعیین ارتباط فیلوژنی آن‌ها می‌باشد. به علاوه حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها برای رسیدن به اطلاعات جهت انتخاب داروی مناسب جهت درمان انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی به‌طور کل ۸۹ نمونه آب، رسوبات، ماهی و میگو از مناطق مختلف خلیج‌فارس جمع‌آوری و مورد ارزیابی جهت جداسازی و شناسایی فنوتیپی و مولکولی ویبریو پاراهمولیتیکوس مورد استفاده قرار گرفتند. سپس جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس‌های کاناگوا مثبت و منفی بر اساس تولید همولیزین شناسایی و ارتباط فیلوژنی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار مگا۶ تعیین گردید. هم‌چنین حساسیت جدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس های کاناگوا مثبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک و کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد مؤثرترین آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش رقت سریالی دوبل محاسبه شد.

یافته‌ها: در مجموع ۹ جدایه ویبریو پاراهمولیتیکوس شناسایی گردیدند. از این جدایه ها ۵ سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگوا مثبت و ۴ سویه کاناگوا منفی بودند. تمامی جدایه‌های ویبریوپاراهمولیتیکوس کاناگوا مثبت و کاناگوا منفی به غیر از یک سویه NSP1 ارتباط قیلوژنی داشتند. آزمون حساسیت جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا(کاناگاوا مثبت) به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که تمامی جدایه‌ها نسبت به وانکومایسین، اگزاسیلین وآمیکاسین مقاوم و به تریمیتوپریم سولفامتوکسازول حساسیت داشتند. کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد مربوط به تریمیتوپریم سولفامتوکسازول و بیشترین غلظت ممانعت کننده از رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتین بوده است.

نتیجه‌گیری: ویبریو پاراهمولیتیکوس‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در خلیج‌فارس وجود دارند. از طرف دیگر این باکتری‌ها تقریباً با یکدیگر ارتباط فیلوژنی دارند که می‌تواند تسهیل کننده انتقال افقی ژن‌ها در بین آن‌ها باشد. به علاوه آنتی‌بیوتیک تریمتو پریم سولفامتوکسازول می‌تواند به‌عنوان گزینه اول درمان عفونت‌های ناشی از ویبریو پاراهمولیتیکوس در این منطقه محسوب گردد.

واژه‌های کلیدی: ویبریو پاراهمولیتیکوس، رابطه فیلوژنی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، 16S rRNA، خلیج فارس

[*]**نویسنده مسئول: مجید باصری صالحی**، کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی ، گروه میکروبیولوژی

Email: majidbaseri@hotmail.com

مقدمه

باکتری‌های جنس ویبریو[1]، از خانواده ویبریوناسه به شکل باسیل خمیده، دارای یک تاژک قطبی، بدون اسپور، متحرک و گرم منفی می‌باشند. این باکتری در دهانه رودها و محیط‌های دریایی به وفور یافت می‌گردد. از بین ویبریوها، گونه پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا و نمک دوست است که بر روی پوست و درون مجرای گوارش برخی از موجودات دریایی مانند میگو، خرچنگ و نرم‌تنان یافت می‌گردد(۱). مصرف فرآورده‌های دریایی و خصوصاً میگو در ایران یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت گوارشی می‌باشد(۲).

بر اساس آنتی‌ژنO ویبریوپاراهمولیتیکوس[2] دارای ۱۱ تیپ و بر اساس آنتی‌ژنK این باکتری دارای ۱۷ تیپ است. مهم‌ترین سرو تیپ آن O3:K6 است که دارای ژن‌های همولیزین مقاوم به حرارت می‌باشد که باعث تولید سم و باعث گاستروانتریت[3] و بیماری‌زا محسوب می گردد(۳). دو ژن کروموزومی در ژنوم باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس وجود دارد که می‌تواند به‌صورت افقی انتقال یابد. این ژن‌ها مسئول تولید دو همولیزین است که هر دو این همولیزین‌ها، ایجاد همولیز بتا بر روی محیط آگار خونی می‌نمایند. این دو ژن tdh, trh که هرکدام مسئول تولید یک همولیزین می‌باشند که با بیماری‌زایی مرتبط هستند(۴). این دو همولیزین باعث از هم گسستگی عملکرد سلول میزبان و فعال شدن مرگ برنامه‌ریزی شده و باعث مرگ سلول میزبان می‌گردد(۵). هردو این همولیزین‌ها از طریق سیستم ترشحی تایپ ۳ وارد سلول میزبان می‌گردند. امروزه نشان داده شده است که باکتری به صورت trh^{-} tdh^{+}دارای سیستم ترشحی T3SS2α و باکتری به‌صورت trh^{+} tdh^{-} ، دارای سیستم ترشحی T3SS2β است(۶). نمونه‌های بالینی ویبریوپاراهمولیتیکوس که موجب همولیز بتا گلبول‌های قرمز انسانی می‌شوند و دارای *tdh* می‌باشند را کاناگاوا مثبت[4] می‌گویند. امروزه یکی از ویژگی‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیکی‌هاست. این مقاومت به روش‌های گوناگون مانند؛ تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده داروها، پمپ افلاسک[5] و تغییر شکل محل هدف اعمال می‌گردد که ژن‌های ایجادکننده مقاومت می توانند به صورت افقی انتقال یابند(۴). با توجه به مطالب عنوان‌شده پژوهش حاضر سعی بر جداسازی ویبریو پاراهمولیتیکوس از مناطق مختلف از خلیج‌فارس و شناسایی فنوتیپی و ملکولی آن‌ها دارد. به‌علاوه در این پژوهش ارتباط فیلوژنی[6] جدایه‌ها والگوی مقاومت دارویی انواع بیماری‌زای آن‌ها تعیین می‌گردد.

روش بررسی

1-*Vibrio*
2-*Vibrio parahaemolyticus*
3-Gastroenteritis
4-Kanagawa positive
5-Efflux pump
6-Phylogeny

مطالعه حاضر یک مطالعه تحلیلی میدانی است، برای انجام این تحقیق ۸۹ نمونه آب، رسوب، ماهی و میگو از مناطق مختلف خلیج‌فارس شامل؛ ۲۴نمونه از جزیره لاوان، ۲۰ نمونه از بندر مقام، ۲۵ نمونه از پارسیان و ۲۰ نمونه ازجزیره هندورابی در فصل تابستان جمع‌آوری گردید. آب و رسوبات بیشتر در مواقعی که به علت باد امواج ایجاد می شدند جمع‌آوری شده و در ظروف استریل دربدار به آزمایشگاه(بر روی یخ) انتقال یافتند. نمونه‌های ماهی و میگو پس از صید جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید، سپس از محتویات روده و پوست نمونه‌گیری به عمل آمد و مورد آنالیز میکروبی قرار گرفتند. زمان نمونه‌گیری از ساعت ۱۰ صبح تا ۵ عصر و حداکثر زمان انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ۲ ساعت تخمین زده شد.

پس از جمع‌آوری نمونه‌های آب و رسوبات و ارسال آن‌ها به آزمایشگاه جهت غنی‌سازی اولیه باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس از محیط آب پپتون قلیایی حاوی ۳ درصد نمک استفاده گردید. بدین گونه که جهت جداسازی ارگانیسم از آب در شرایط استریل ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ گردید و نمونه رسوبات پس از افزودن به ۹ میلی‌لیتر آب پپتون قلیایی حاوی ۳ درصد نمک به مدت ۲۴ـ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس گرم خانه گذاری شدند. پس از این دوره سوسپانسیون را بر روی محیط آگار تیو سولفات سیترات بایل سالت سوکروز[1] به صورت خطی کشت داده شد وبه مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس گرم خانه گذاری شد. شناسایی اولیه ویبریو پاراهمولیتیکوس بر اساس مشاهده کلنی‌هایی آبی(که توانایی مصرف قند سوکروز را ندارند)، رنگ‌آمیزی گرم(باکتری گرم منفی و خمیده)، رشد در نمک ۳ درصد، ۶ درصد، ۸ درصد و کیت‌های Api 20 NE (بیومریکس[2]) انجام گردید(۷ و ۱).

جهت ارزیابی واکنش کاناگاوا در جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس، محیط پایه وا گا تسما (با فرمول پپتون ۱۰ ، عصاره مخمر۳، سدیم کلرید۷، منیتول۱۰، کریستال ویولت۰.۰۰۱ و آگار۱۵ گرم در لیتر و pH ۸) آماده‌سازی گردید و با استفاده از اتوکلاو(دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس ، ۱۵ دقیقه) استریل شدند. پس از استریل شدن، دمای محیط پایه وا گا تسما[3] را کاهش داده و اریتروسیت انسانی (سه بار شسته شده با سرم فیزیولوژی) به میزان ۵ درصد به محیط اضافه گردید. سپس جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس به صورت خطی بر روی محیط وا گا تسما کشت داده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از این دوره کلنی‌هایی که تولید همولیز بتا کرده بودند را به عنوان کاناگاوا مثبت قلمداد و ثبت گردیدند(۸).

برای شناسایی ملکولی جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس، ابتدا ۲ میلی‌لیتر از کشت تازه

1- Thiosulfate citrate bile sucrose agar
2- Biomeriex
3- Wagatsuma basic agar

باکتری‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس در میکروتیوپ‌های استریل ریخته و در ۷۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و محلول رویی دور ریخته شدند. استخراج DNA در تحقیق حاضر بر اساس کیت سینا کولن ایران و دستورالعمل این کیت انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق "7F;5"TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3 و 1492R;5AGGAGGTGATCCAACCGCA-3 می‌باشد(۶). واکنش زنجیره ایی پلی‌مراز در ۳۰ سیکل حرارتی دماهای ۹۸ درجه سانتی‌گراد دمای دناتوراسیون، ۵۶ درجه سانتی‌گراد دمای اتصال پرایمر و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکثیر ژن انجام گرفت و محصول به‌دست‌آمده برای توالی یابی به کمپانی ماکروجین کره(http://www.macrogen.com) فرستاده شد. سپس توالی‌های ژنی به دست‌آمده در سایت ان سی بی آی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) هم ردیف‌سازی شدند.

ارتباط فیلوژنی جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس در تحقیق حاضر با استفاده از نرم‌افزار مگا ۶ ارزیابی گردید. از طرف دیگر میزان ارتباط این باکتری‌ها با استفاده از آزمون آماری تاجیماس محاسبه شد. برای تعیین ارتباط فیلوژنی، توالی ژنی جدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس (بر اساس16SrRNA) و دو توالی ویبریو پاراهمولیتیکوس استاندارد و ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگوا مثبت که از بانک ژنی NCBI بارگذاری شده در نرم افزار مگا ۶ قرار داده و درخت فیلوژنی رسم گردید(۱۰ و۹).

جهت بررسی حساسیت جدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس به آنتی‌بیوتیک‌ها ابتدا هریک از جدایه‌ها را در ۵ سی‌سی محیط کشت مایع مغذی کشت داده وپس از ۲۴ ساعت کدورت لوله‌ها با نیم مک فارلند مقایسه شدند. به منظورانجام تست، میکروارگانیسم مورد نظر را بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ۳ درصد نمک کشت سفره‌ای داده و سپس از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول(۱/۲۵/۲۳/۷ میکروگرم) ،سفتریاکسون(۳۰ میکروگرم)، سفکسیم(۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین(۵ میکروگرم)، آمیکاسین(۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین(۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین(۱۰ میکروگرم) و نیتروفورانتئین(۳۰۰ میکروگرم) (شرکت پادتن طب، ساخت ایران) با رعایت شرایط استاندارد در سطح پلیت قرار داده شد و در نهایت محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند.

باکتری حساس در این تست تولید منطقه ممانعت از رشد می نماید که بر اساس قطر منطقه عدم رشد و مقایسه آن با جدول استاندارد CLSI حالت‌های مقاوم، میانه وحساس تعیین گردیدند(۱۱).

جهت ارزیابی مؤثرترین آنتی‌بیوتیک بر جدایه‌های کاناگاوا مثبت کمترین غلظت ممانعت کنندگی MIC آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر جدایه‌های ویبریو

پارا همولیتیکوس مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام واکنش در ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند($۱/۵ * ۱۰^{۸}$ cell/ml) در محیط مایع آنفوزون قلب و مغز تهیه شده و ۱ میلی‌لیتر از رقت های مختلف هر آنتی‌بیوتیک (که با استفاده از آب مقطر استریل تهیه شده) به سوسپانسیون‌های میکروبی اضافه گردید. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت کمترین غلظت ممانعت کنندگی از رشد بر اساس غلظت اولین لوله بدون رشد مشخص و ثبت گردید(۱۲).

یافته‌ها

در تحقیق حاضر باکتری ویبریو از تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده جدا گردید. اگرچه ۹ باکتری مشکوک به ویبریو پاراهمولیتیکوس بر اساس تشکیل کلنی آبی بر روی محیط تیو سولفات سیترات بایل سالت سوکروزآگار، تست کاتالاز، اکسیداز مثبت و رشد در محیط آب پپتون ۳ درصد جدا گردیدند، بیشترین میزان جدا سازی از نمونه میگو(۴ باکتری) سپس ماهی(۳ باکتری) و کمترین میزان از نمونه آب و رسوبات(هر کدام ۱ باکتری) بوده است. بیشترین میزان ویبریو پاراهمولیتیکوس از بندر مقام(۴سوش) و کمترین میزان از ازجزیره هندورابی و پارسیان (هر کدام تنها ۱ سوش)جدا گردید.

نتایج به‌دست‌آمده از شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها با استفاده از کیت Api 20 NE بیانگر تأیید جداسازی اولیه بوده است که نشان دهنده جداسازی ۹ سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس می‌باشد.

نتایج به دست‌آمده از غربالگری جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت نشان داد که از ۹ جدایه، ۵ جدایه دارای واکنش کاناگوا بوده است، که این به معنای تولید همولیزین بوسیله این جدایه‌ها می‌باشد. در این روند بیشترین جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت از میگو(۳) و سپس ماهی(۲) شناسایی شدند. قابل توجه این که از نمونه‌های آب و رسوبات ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت جدا نگردید.

جهت تأیید شناسایی فنوتیپی، ۹ جدایه ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت و منفی با استفاده از توالی ژن 16SrRNA مورد ارزیابی قرارگرفتند. شکل۱ محصول PCR هر یک با استفاده از پرایمر 16S-27F و 16S-1492R توالی‌های حدود ۱۵۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد.

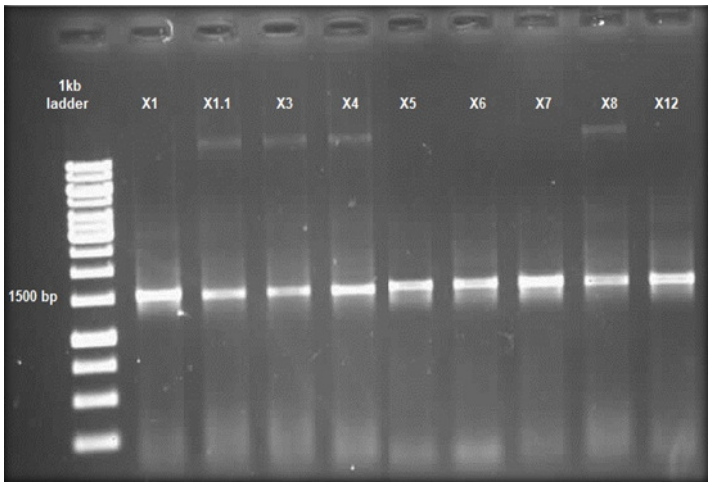
جدول ۱ نشان دهنده آنالیز آلایمنت ژن 16SrRNAجدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگوا مثبت می‌باشد. همان‌گونه که در این جدول مشاهده می‌شود سویه های مختلف باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس از نمونه‌های جمع‌آوری شده از خلیج‌فارس جدا شده است که به علت تولید همولیزین به احتمال زیاد همگی دارای ژن‌های tdh, trh می‌باشند.

نتایج به‌دست‌آمده از ارتباط فیلوژنی جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت و

منفی با استفاده از نرم‌افزار مگا ۶ و آزمون آماری تاجیماس نشان داد که سویه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس جدا شده به غیر از سویه(NSP1) با سویه کنترل کاناگاوا مثبت ارتباط فیلوژنی دارند(شکل ۲). اگرچه سویه‌های کاناگاوا منفی پس از رسم درخت فیلوژنی ارتباط مستقیمی با ویبریو پاراهمولیتیکوس‌های کاناگاوا مثبت نداشتند، اما در آزمون تاجیماس ارتباط آنها به صورت معنی‌دار محاسبه گردید. در بین جدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس ارتباط سویه NSP1 با سایر ویبریو پاراهمولیتیکوس‌های کاناگاوا مثبت و منفی معنی‌دار نبود.

چنانچه در جدول ۲ مشاهده می گردد جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مقاومت و حساسیت نشان دادند. تمامی جدایه‌ها نسبت به آمیکاسین مقاوم بودند. از طرف دیگر این جدایه‌ها نسب به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول حساسیت نشان دادند و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت‌های گوناگون نسبت به جدایه‌ها پاسخ دادند.

نتایج به‌دست‌آمده از تعیین کمترین غلظت ممانعت کنندگی از رشد نشان داد که کمترین غلظت مربوط به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و بیشترین غلظت مربوط به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتین می‌باشد.



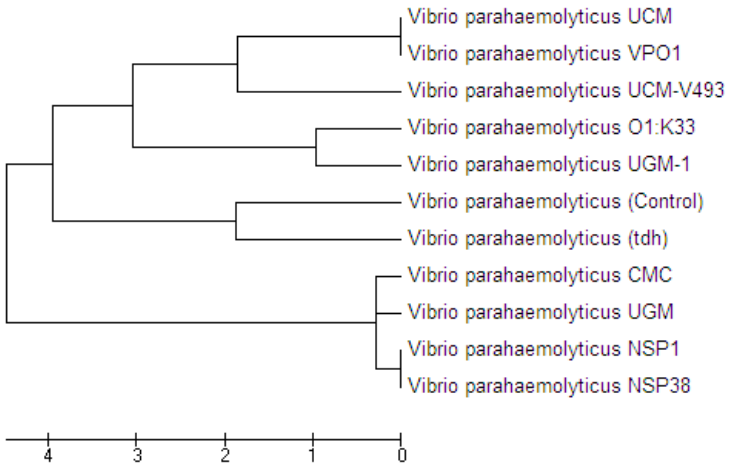
شکل۱: ژل الکتروفورزیس، باندهاي تکثیر شده 16SrRNA مربوط به ۹ جدایه ویبریو

حروف همراه با اعداد مندرج در شکل نشان دهنده شناسه جدایه مي باشد

جدول۱: آنالیز آلایمنت ژن 16SrRNAجدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگوا مثبت و منفی

جنس و گونه	کد دسترسی	جدایه
Vibrio parahaemolyticus NSP1	Gbjn188415.1	X1
Vibrio parahaemolyticus UCM	Gbcp007004.1	X2
Vibrio parahaemolyticus O1:K33	Gbcp006008.1	X3
Vibrio parahaemolyticus NSP35	Gbjn188415.1	X4
Vibrio parahaemolyticus UCM-V493	Gbcp007005.1	X5
Vibrio parahaemolyticus VPO1*	Gbjn188420.1	X6
Vibrio parahaemolyticus CMC*	Gbcp007004.1	X7
Vibrio parahaemolyticus UGM*	Gbcp007004.1	X8
Vibrio parahaemolyticus UGM-1*	Gbcp007004.1	X12

*** جدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگوا منفی**



شکل ۲ : ارتباط فیلوژنی جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت و منفی

جدول ۲ : نتایج آنتی‌بیوگرام آنتی‌بیوتیک‌ها بر جدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت در شرایط آزمایشگاهی

جدایه ها / آنتی‌بیوتیک	X5*	X4	X3	X2	X1
آمیکاسین	R †/۶	R/۶	R/۶	R/۶	R/۶
جنتامایسین	R/۶	R/۱۴	R/۶	R/۶	R/۹
سیپروفلوکساسین	R/۱۰	R/۲۲	I/۱۴	S/۱۶	I/۱۴
نیتروفورانتین	R/۱۴	S/۲۶	I/۱۶	S/۲۶	I/۱۶
تری متوپریم سولفامتوکسازول	R/۶	R/۶	R/۶	R/۶	R/۶
سفتریاکسون	R/۱۴	S/۲۶	S/۱۸	S/۳۰	I/۱۵
سفکسیم	S/۱۶	S/۲۴	S/۱۷	S/۲۴	S/۱۶

† اعداد مندرج در جدول میانگین سه تکرار بر اساس میلی متر می‌باشد .

*حروف همراه با اعداد مندرج در جدول اختصارهای ویژگی های

R:مقاومت S:حساسیت I: میانه می باشند.

بحث

ویبریو پاراهمولیتیکوس یکی از باکتری‌های وابسته به محیط‌های آبی است که باعث گاستروانتریت، سپتی سمی و زخم در انسان می‌گردد. این باکتری از ارگانیسم‌های بومی آب‌های خلیج فارس است(۱۲) که در تحقیق حاضر سعی بر تعیین ارتباط فیلوژنی و ارزیابی حساسیت آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد.

خلیج‌فارس که به عنوان گرم‌ترین پهنه آبی دنیا شناخته شده است به علت ویژگی منحصر به فرد (فیزیکی و شیمیایی) و تنوع موجودات یکی از مناسب ترین جایگاهها برای رشد وتکثیر ویبریو پاراهمولیتیکوس می‌باشد. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که ویبریو پاراهمولیتیکوس در میگو و ماهی آبهای خلیج‌فارس وجود دارد. همانند این یافته پیغان و همکاران وجود ویبریو پاراهمولیتیکوس در آبهای خلیج‌فارس منتهی به خوزستان و بوشهر به علت پرورش ماهی و میگو گزارش کرده بودند(۱۳). نتایج به دست آمده از جداسازی این باکتری‌ها از نمونه‌های میگو، ماهی، رسوبات و آب نشان داد که ویبریو پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا (کاناگاوا مثبت) از میگو به میزان بیشتری جدا گردید که می‌تواند به علت بهینه بودن محیط‌های زندگی این آبزی و شرایط مناسب دستگاه گوارشی و پوست آنها برای رشد این باکتری باشد. نتایج مشابه در ارتباط با زیاد بودن ویبریو پاراهمولیتیکوس در میگو به وسیله یانگ و همکاران(۱۴). گزارش شده است. از طرف دیگر میزان جدا سازی ویبریو پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا (کاناگوا مثبت) نسبت ویبریو پاراهمولیتیکوس غیر بیماری‌زا (کاناگوا منفی) از نمونه‌های گرفته شده در تحقیق حاضر بیشتر می‌باشد که الزاماً رعایت بهداشت و طبخ مناسب در زمان استفاده غذاهایی که از آبزیان خلیج فارس می‌باشد پیشنهاد می گردد. اوتاویانی و سانتارلی مطالعه‌ای را بر روی غذاهای دریایی انجام دادند و نشان دادند که از ۱۴۴ گونه ویبریو پاراهمولیتیکوس، ۳۵ سویه(۲۴/۳۰ درصد) ویبریو پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا (کاناگوا مثبت) بوده است. بنا بر مصرف غذاهای دریایی آلوده به ویبریو پاراهمولیتیکوس به دلیل حدت بالای بعضی از سوش‌ها خطرناک در نظر گرفتند(۱۵).

در تحقیقی که به وسیله جلالی و همکاران در شهر اصفهان جهت جداسازی ویبریوها از غذاهای دریایی مانند ماهی و میگو انجام گرفته است۴۱۱ نمونه ماهی و میگو از بازارهای عمومی جمع‌آوری شد که از این نمونه ها به‌طور کل ۱۶ نمونه(۳/۹ درصد) آلوده تشخیص داده شد. از نمونه‌های آلوده ۶ مورد ویبریو پاراهمولیتیکوس(۱/۵ درصد) و ۱۰ نمونه آلوده به دیگر ویبریوها بوده است(۱۶). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که از ۸۹ نمونه جمع‌آوری شده ۹ سوش ویبریو پاراهمولیتیکوس جدا گردید که حدود ۲۳/۵ درصد می‌باشد که در قیاس با دیگر مطالعه‌ها میزان بیشتری تخمین زده می‌شود. علت افزایش میزان جداسازی ویبریو پاراهمولیتیکوس در

تحقیق حاضر می‌توان فصل نمونه گیری، تازه بودن نمونه‌ها و شرایط فیزیوشیمیایی آب خلیج‌فارس در نظر گرفته شود. بنابر این وجود ویبریو پاراهمولیتیکوس در خلیج فارس در فصل تابستان می‌تواند استفاده از غذاهای دریایی به خصوص میگو را محدود نماید.

از نظر مقاومت دارویی تحقیق حاضر نشان داد که تمامی جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت نسبت به آمیکاسین مقاوم وبه تری متوپریم سولفامتوکسازول حساسیت داشتند. اگرچه دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت‌های گوناگون نسبت به جدایه‌ها پاسخ دادند. در این روند رودریگز و همکاران الگوی دیگری از نظر حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش نمودند به گونه‌ایی که جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا(۹۰ درصد) و (۶۰ درصد) به ترتیب به آمپی‌سیلین و آمیکاسین مقاوم و ۱۰۰ درصدبه کلرامفینیکل حساس بودند(۱۷). این یافته بیان‌گر عدم توانایی در ارایه الگویی مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از ویبریو پاراهمولیتیکوس را می‌دهد. اگرچه الهادی و همکاران در مقاله‌ای مروری بیشتر جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا را بدون درنظر گرفتن منطقه جغرافیایی مقاوم به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین و تتراسیکلین دانسته‌اند(۱۸)، اما نتایج حاضر و مقایسه با دیگر گزارش‌ها الگوی درمان آنتی‌بیوتیکی برای عفونت‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس را بر اساس منطقه جغرافیایی پیشنهاد می‌نماید.

در تحقیق حاضر از توالی ژن 16S rRNA برای تعیین ارتباط فیلوژنی ویبریو پاراهمولیتیکوس بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا استفاده گردید. ژن‌ها مسئول تولید دو همولیزین ***tdh, trh*** که پتانسیل بیماری‌زایی را به ویبریو پاراهمولیتیکوس القا می‌کنند به صورت افقی قابل انتقال می‌باشند. بنابر این برای تعیین ارتباط فیلوژنی ویبریو پاراهمولیتیکوس مناسب نمی‌باشند، در حالی که ژن 16S rRNA قادر به انتقال افقی نبوده و در ابعاد بسیار وسیع در علم متاژنومیک برای تعیین گوناگونی باکتری‌ها در محیط استفاده می‌گردد. از طرف دیگر ژن 16S rRNA به علت خاصیت اتصال به توالی شین دالگارنو mRNA و مشارکت در ترجمه ژن‌ها برای تعیین ارتباط فیلوژنی مناسب تشخیص داده شده است(۱۹ و ۱۰). نتایج پژوهش حاضر از ارزیابی ارتباط فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار مگا۶ نشان داد که ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت و منفی به غیر از یک سویه NSP1 وابستگی فیلوژنی داشتند که البته برای تعیین علت عدم ارتباط فیلوژنی سویه NSP1 نیاز به تحقیق‌های بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی تحقیق حاضر ضمن اثبات وجود ویبریو پاراهمولیتیکوس در آب‌های خلیج‌فارس، درصد قابل توجهی از این باکتری‌ها را برای انسان بیماری‌زا شناسایی می‌نماید. از طرف دیگر ویبریو پاراهمولیتیکوس‌های غیر بیماری‌زای خلیج‌فارس به

علت ارتباط فیلوژنی با گونه‌های بیماری‌زا و انتقال افقی ژن‌ها در بین آنها می‌توانند بیماری‌زا گردند. به علاوه به‌طور معمول درمان بیماری‌های گوارشی در ایران با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های تری متو پریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون و سفکسیم انجام می‌گردد که تحقیق حاضر آنتی‌بیوتیک تری متو پریم سولفامتوکسازول را به عنوان گزینه اول درمان عفونت‌های ناشی از ویبریو پاراهمولیتیکوس پیشنهاد می نماید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از همراهی و کمک های بی دریغ مدیر گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شیراز تقدیر و تشکر می نمایند.

REFERENCES

1.Wu Y, Wen J, Ma Y, Ma X, Chen Y. Epidemiology of food borne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003-2008. *Food Control* 2014; 46: 197–202.
2.Hosseini S, Safarpor dehkorde F, Rahemi E, Shakerian A. Study on prevalence of *Vibrio* spp. and frequency of invasive genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh and salty shrimp in Genaveh city. *Food Hygiene Journal* 2014; 2: 17-26.
3.Velazquez RJ, León-SN, Flores Villaseñor H, Villafaña RS, Canizalez RA. Association of pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6 present in the coastal environment of Northwest. Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(6): 1794-803.
4.Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front Microbiol* 2014; 5: 705.
5.Zhang L, Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16(1): 70-7.
6.Noriea N, Johnson CN, Griffitt KJ, Grimes DJ. Distribution of type III secretion systems in *Vibrio parahaemolyticus* from the northern Gulf of Mexico. J*ournal of Applied Microbiology* 2010; 109(3): 953-62.
7.Hassanzadeh Y, Bahador N., Baserisalehi M. Isolation and phenotypic Identification of Vibrio alginolyticus as a symbiotic with sponge of Persian gulf using API 20NE kit marine. *Biology Journal* 2014; 26: 61-8.
8.Okuda J, Nishibuchi M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. *Molecular Microbiology* 1998; 30(3): 499–511.
9.Haley BJ, Kokashvili T, Tskshvediani A, Janelidze N, Mitaishvili N, Grim CJ. *et al*. Molecular diversity and predictability of *Vibrio parahaemolyticus* along the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Front Microbiol* 2014; 5: 45.
10.Dorsch M, Lane D, Stackebrandt E. Towards a phylogeny of the genus Vibrio based on 16S rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42(1): 58-63.
12.Kim M, Kwon TH, Jung SM, Cho SH, Jin SY, Park NH, Kim CG, Kim JS. Antibiotic resistance of bacteria isolated from the internal organs of edible snow crabs. *PLoS One* 2013; 8(8): 70887.
12.Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and Vibrio vulnificus in various countries A review. *Food Microbiology* 2016; 57: 128–34.
13.Payghan R, Behi A, Dashtyan A, Ghaeednea B, Yaghaneh V. Evaluation of the effect of submerging and *Vibrio* on mortality of shrimps and histopathology. *Ahvaz Science and Research* 2011; 6: 51-8.
14.Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, Cao GX, Fang WM, Gu RX. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 125(3): 279-85.
15.Ottaviani D, Santarelli S, Bacchiocchi S, Masini L, Ghittino C, Bacchiocchi I. Presence of pathogenic Vibrio parahaemolyticus strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy**.** *Food Microbiology* 2005; 22(6): 585-90.
16.Jalali M, Mahdavi M, Javadi A, Khoresh F, Ataee B, Adede D. Contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in sea food in Esfahan city. *Infection and Tropic Diseases* 2008; 14(33): 33-6.
17.Rodrigues deMlo LM, Almeida D, Hofer E, Reis CMF, Theophilo GND, et al. Antibiotic resistance of Vibrio parahaemolyticus isolated from pond-reared Litopenaeus vannamei marketed in natal. *BrazilBraz J Microbiol* 2011; 42(4): 1463–9.
18.Elhadi N, Radu S, Chen CH, Nishibuchi M. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *J Food Prot* 2004; 67(7): 1469-75.
19.Lin Y, Chang BCH, Chiang P, Tang S. Questionable 16S ribosomal RNA gene annotations are frequent in completed microbial genomes. *Gene* 2008; 416: 44–7.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Determination of Phylogenetic Relationship Among *Vibrio Parahaemolyticus* Isolates from Persian Gulf and the Evaluation of their Susceptibility to Antibiotics

Haghnegahdar S[1], Baserisalehi M[2*]

[1]Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, [2]Department of Microbiology, Kazeroun Branch, Islamic Azad University Kazeroon, Iran

Received: 19 Feb 2016 Accepted: 29 Aug 2016

Abstract

Background & aim: *Vibrio parahaemolyticus* is a Gram negative halophilic bacterium found in aquatic environments. This bacterium has been introduced as a cause of acute gastroenteritis following the consumption of raw and uncooked seafood. Major symptoms of *Vibrio parahaemolyticus* illness is watery diarrhea, abdominal cramps, Nausea, Vomiting, Fever, Headache and Bloody diarrhea. The purpose of this study was isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from Persian Gulf and the determination of their phylogenetic relationship. In addition, antibiotic susceptibility of the isolates was evaluated in order to achieve maximum information concerning a drug of choice.

Methods: In this study, 89 samples of water, sediments, fish and shrimp were collected from different regions of the Persian Gulf. All samples were asssessed for phenotypic and molecular isolation and identification of Vibrio parahaemolyticus. Then the positive and negative strains of conagua vibrio parahaemolyticus were determined based on hemolysin production. the identification and phylogenetic relationship were analyzed using the mega-6 software. Finally susceptibility of Kanagawa positive *Vibrio parahaemolyticus* to antibiotics was evaluated by disk diffusion method and minimal inhibitory concentrations of effective antibiotics were assessed using double serial dilution method.

Results: A total of nine *Vibrio parahaemolyticus* were isolated and identified. Of all isolates five strains were Kanagawa positive and four were Kanagawa negative. All isolates exhibited phylogenetic relationship to each other except one strain (NSP1). The results obtained from antibiotic susceptibility of Kanagawa positive *Vibrio parahaemolyticus* isolates illustrated that most of the isolates were resistance to Vancomycin, Oxacillin, and Amikacin and susceptible to Trimetoprim Sulfometaxazole respectively. In addition, the lowest Minimal inhibitory Concentration (MIC) value was found for Sulfometaxazole and highest MIC value was found for Nitofuran.

Conclusion: The present study illustrated that both pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* existed in the persian Gulf. On the other hand these bacteria that could facilitate phylogenetic relationship with each other because of horizontal gene transfer among them.Trimetoprim Sulfometaxazole could be considered a durg of choice for treatment of the patient suffering from *Vibrio parahaemolyticus* infections.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus,* phylogenetic relationships, antibiotic susceptibility, 16SrRNA, Persian Golf

[*]**Corresponding author: Baserisalehi M,** Department of Microbiology, Kazeroun Branch, Islamic Azad University Kazeroon, Iran
Email: majid baseri@hotmail.com

Please cite this article as follows:
Haghnegahdar S, Baserisalehi M. Determination of Phylogenetic Relationship Among Vibrio Parahaemolyticus Isolates from Persian Gulf and the Evaluation of their Susceptibility to Antibiotics. Armaghane-danesh 2016; 21 (6): 505-616.